



TITLE:

合成小分子化合物群を用いたペプチド性天然化合物合成酵素に対する網羅的機能解析技術の開発に関する研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

笠井, 昭太

CITATION:

笠井, 昭太. 合成小分子化合物群を用いたペプチド性天然化合物合成酵素に対する網羅的機能解析技術の開発に関する研究. 京都大学, 2016, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19671>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により全文は2021-09-01に公開; 許諾条件により要約は2017-03-22に公開; 許諾条件により要旨は2016-06-22に公開

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	笠井 昭太
論文題目	合成小分子化合物群を用いたペプチド性天然化合物合成酵素に対する網羅的機能解析技術の開発に関する研究		

微生物が産生するペプチド性天然化合物は、その構造的および生物活性の多様性から重要な研究ツールとなり創薬シーズとなってきた。また、薬剤耐性菌を含む病原細菌の多くは、病原性因子として必須の機能を果たすペプチド性化合物を産生する。このような天然化合物は、非リボソーム性ペプチド合成酵素 (NRPS) によって合成される。そのため、病原細菌の二次代謝経路は新たな創薬標的としても注目されている。NRPSは複数の酵素ドメインを有する巨大タンパク質であるため、その全長を組換えタンパク質として発現及び精製し、試験管内で評価することは容易ではない。また、部分的に切出して調製する場合も、本来の機能を失っている可能性もある。そこで、生体内を含む夾雑系に存在するこれら酵素群を迅速かつ簡便に機能評価できれば、遺伝子工学的手法と相補的な技術の確立につながる。さらには、病原細菌の二次代謝制御を指向した創薬基盤技術が構築できると期待されている。そこで、本研究では、合成小分子化合物群を用いた内在性NRPSの網羅的機能解析技術の開発を行った。

《第一章・競合的activity-based protein profiling (ABPP) による内在性NRPSアデニレーション (A) ドメインの網羅的機能解析》

NRPS Aドメインは非常に厳密な基質特異性を有し、20種の天然アミノ酸や非天然アミノ酸などの生体内プールの中から特異的に1つを高反応性中間体であるアミノアシル-AMPに活性化する (Fig. 1)。アミノアシル-AMPは、下流の担体タンパク質 (CP) のホスホパンテテイン (Ppant) 末端のチオール基から求核攻撃を受ける事で、基質となるアミノ酸がCP上に担持され、ペプチド性天然化合物の合成が進行する。つまり、Aドメインはペプチド性天然化合物合成における”ゲートキーパー”としての役割を担っている。そのため、Aドメインはタンパク質工学の魅力的な標的となってきた。例えば、mutasynthesisを用いて非天然化合物を創出するためには、Aドメインの機能を網羅的に解析することが鍵となる。そこで、Aドメインに高い

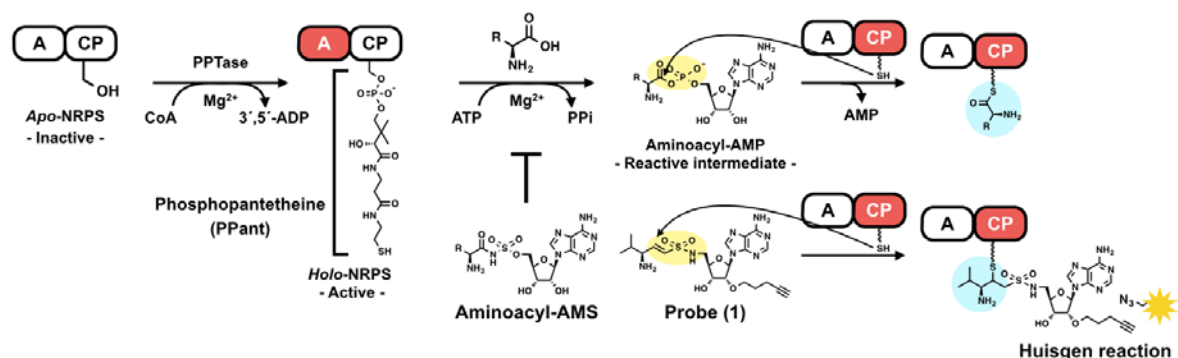


Fig. 1 NRPSの翻訳後修飾及び触媒機構とアミノアシル-AMS及び化学プローブ (1) の構造とその反応機構

結合能を有するアミノアシル-AMPの生物学的等価体であるアミノアシル-AMSライブラリーを構築し、Aドメインに対するラベル化剤を組み合わせた競合的ABPPを行うことで、夾雑系に存在するNRPS Aドメインの網羅的機能解析が可能になると期待した。20種類のアミノアシル-AMSライブラリーを合成し、競合的ABPP実験を行った。その結果、Aドメインの阻害剤に対するプロファイルと酵素活性（基質特異性）は良く一致した。これにより、夾雑系に存在する内在性NRPSの個々のAドメインを迅速かつ簡便に機能評価することが可能となった。

《第二章・NRPS担体タンパク質 (CP) の翻訳後修飾を標的とした分子ツールの開発》

病原細菌の多くは、病原性因子として必須の役割を果たすペプチド性天然化合物をNRPSにより合成する。NRPS活性は、CPの翻訳後修飾 [ホスホパンテテイン (Ppant) 化] によって、厳密に制御されている。そのため、翻訳後修飾導入酵素 (ホスホパンテテインルトランスフェラーゼ、PPTase) は新たな創薬標的として期待されている。しかしながら、生体内を含む夾雑系において、CPの翻訳後修飾を検出する手法が存在しないため、これまで生体内におけるPPTase活性の解析は限定されてきた。そこで、内在性NRPS CPの翻訳後修飾を選択的に検出する分子ツールの開発を行った。NRPSと選択的に反応することを期待して高反応性中間体であるアミノアシル-AMPを模倣し、Ppant末端のチオール基がアミノアシル-AMPに求核攻撃する位置にマイケルアクセプターであるビニルスルホンアミドを導入したリガンドを設計した (Fig. 1)。また、Huisgen環化付加反応によるタグ分子の導入を目的にアデノシンの2'位水酸基に末端アルキンを持つL-Val型プローブ (**1**) を合成した。L-Val型プローブ (**1**)を用い、大腸菌組換えタンパク質 [A (L-Val特異的)-CP] 及び内在性NRPSを用いた標識化実験を行った。その結果、**1**はリガンド部のアミノ酸に基質特異性を有するAドメインに基質として認識されることで、その下流に存在するCPの翻訳後修飾を選択的に検出できることを明らかにした。

本研究では、合成小分子化合物群を用いた夾雑系に存在するペプチド性天然化合物合成酵素のAおよびCPドメインの機能解析技術の開発を行った。競合的ABPPを用いたAドメインの網羅的機能解析を利用することで、非天然化合物をmutasynthesisにより設計することが可能になると期待している。また、第一章および第二章の技術を基盤とすることで、新たな作用点を有する抗菌薬を開発することに道を拓き、薬剤耐性菌感染症を制御する新たな治療法の開発が可能になることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

微生物が産生するペプチド性天然化合物は、その構造的および生物活性の多様性から重要な研究ツールとなり、かつ創薬シーズとして利用可能である。また、薬剤耐性菌を含む病原細菌の多くは、病原性因子として必須の機能を果たすペプチド性化合物を産生ため、病原細菌の二次代謝経路は新たな創薬標的としても注目されている。このようなペプチド性天然化合物は、非リボソーム性ペプチド合成酵素 (NRPS) によって合成されており、NRPSは複数の酵素ドメインを有する巨大タンパク質であるため、その全長を組換えタンパク質として発現及び精製し、試験管内で評価することは容易ではない。また、部分的に切出して調製する場合も、本来の機能を失っている可能性もある。そのため、生体内を含む夾雑系に存在するこれら酵素群を迅速かつ簡便に機能評価できれば、遺伝子工学的手法と相補的な技術の確立につながる。さらには、病原細菌の二次代謝制御を指向した創薬基盤技術の構築が多能となる。そこで、著者は、合成小分子化合物群を用いた内在性NRPSの網羅的機能解析技術の開発を行った。

すなわち、著者は、Aドメインに高い結合能を有するアミノアシル-AMPの生物学的等価体であるアミノアシル-AMSライブラリーを構築し、Aドメインに対するラベル化剤を組み合わせた競合的activity-base protein profiling (ABPP) を行うことで、夾雑系に存在するNRPS Aドメインの網羅的機能解析を行った。その結果、Aドメインの阻害剤に対するプロファイルと酵素活性 (基質特異性) は良く一致することを明らかにし、夾雑系に存在する内在性NRPSの個々のAドメインを迅速かつ簡便に機能評価することを可能にした。

病原細菌の多くは、病原性因子として必須の役割を果たすペプチド性天然化合物をNRPSにより合成する。NRPS活性は、CPの翻訳後修飾 [ホスホパンテテイン (Ppant) 化] によって、厳密に制御されている。そこで、翻訳後修飾導入酵素 (ホスホパンテテインイルトランスフェラーゼ、PPTase) は新たな創薬標的として期待されている。しかし、生体内を含む夾雑系において、CPの翻訳後修飾を検出する手法が存在しないため、これまで生体内におけるPPTase活性の解析は限定されてきた。そこで、著者は、内在性NRPS CPの翻訳後修飾を選択的に検出する分子ツールの開発を行った。NRPSと選択的に反応することを期待して高反応性中間体であるアミノアシル-AMPを模倣し、Ppant末端のチオール基がアミノアシル-AMPに求核攻撃する位置にマイケルアクセプターであるビニルスルホンアミドを導入したりガンドを設計し合成した。また、Huisgen環化付加反応によるタグ分子の導入を目的にアデノシンの2'位水酸基に末端アルキンを有するL-Val型プローブ (**1**) を合成した。L-Val型プローブ (**1**)を用い、大腸菌組換えタンパク質 [A (L-Val特異的)-CP] 及び内在性NRPSを用いた標識化実験を行った。その結果、**1**はリガンド部のアミノ酸に基質特異性を有するAドメインに基質として認識されることで、その下流に存在するCPの翻訳後修飾を選択的に検出できることを明らかにした。

以上のように、著者は、合成小分子化合物群を用いた夾雑系に存在するペプチド性

天然化合物合成酵素のAおよびCPドメインの機能解析技術の開発を行った。競合的ABPPを用いたAドメインの網羅的機能解析を利用することで、非天然化合物をmutasynthesisにより設計することが可能となり、さらに、本研究成果は新たな作用点を有する抗菌薬を開発することに道を拓き、薬剤耐性菌感染症を制御可能な治療法の開発にも繋がることが期待される。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年2月29日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 2016年 6月 22日以降